

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Tübingen a. N.

Präsident: Professor Dr. E. Traub

*vorgelegt vom Tierhygienischen Institut der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München*

Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

Über das Verhalten des Virus der Maul- und Klauenseuche beim Einfrieren und Auftauen in Gegenwart verschiedener Medien

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER

VETERINÄRMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE

DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT

DER LUDWIG-MAXIMILIAN-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

von

HANNS STORZ

aus

Hardt — Kreis Rottweil



München 1957

Veröffentlicht im „Zentralblatt für Veterinärmedizin“ Band V, Heft 5 (1958) Seiten 405.—430

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere Tübingen a. N.

Über das Verhalten des Virus der Maul- und Klauenseuche beim Einfrieren und Auftauen in Gegenwart verschiedener Medien

Von

HANN S TORZ

Mit 5 Abbildungen

(Eingegangen am 10. März 1958)

Inhalt: I. Einleitung. II. Materialien und Methoden. 1. Virus, 2. Virusgewinnung, 3. Mäuse, 4. Medium, 5. pH-Messung, 6. Bestimmung der Viskosität, 7. Kältequellen, 8. Technik des Einfrierens, 9. Titration der Infektiosität, 10. Versuchsverlauf. III. Eigene Versuche. 1. Veronal-Puffer, 2. Glykokoll-Puffer, 3. Borat-Puffer, 4. Borsäure-Soda-Puffer nach Atkins und Pantin, 5. Isotonischer Phosphat-Puffer, 6. Phosphat-Puffer nach Sörensen, 7. Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung, 8. Ringer-Locke-Tris-Lösung, 9. Rinderamniönflüssigkeit, 10. Versuche mit viskositäts erhöhenden Mitteln. IV. Vergleichende Auswertung der Ergebnisse. 1. Bedeutung der Geschwindigkeit des Einfrierens und Auftauens, 2. Die pH-Abhängigkeit, 3. Die Abhängigkeit der Schädigung von der Molarität verschiedener Puffer, 4. Der Einfluß der Viruskonzentration auf die Virusschädigung, 5. Die Bedeutung der Viskosität des Lösungsmittels für die Erhaltung von MKS-Virus beim Gefrierprozeß, 6. Puffersysteme, die sich zum Einfrieren von MKS-Virus eignen, 7. Puffersysteme, die im gefrorenen Zustand ihren pH-Wert ändern. V. Diskussion der Ergebnisse. Zusammenfassung. Literaturverzeichnis.

Die Tatsache, daß tiefe Temperaturen konservierend auf Virusarten wirken, ist seit langem bekannt. Man bedient sich daher in allen modernen Instituten des Einfrierens, um die Virusaktivität für lange Zeitspannen zu erhalten. Hierbei wurde jedoch die Beobachtung gemacht, daß das Gefrieren und Auftauen unter gewissen Umständen zu erheblichen Aktivitätsverlusten führen kann. Dies gilt in besonderem Maße für das stark pH-empfindliche und auch sonst wenig resistente Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS).

Aus der Fachliteratur geht hervor, daß viele pathogene Mikroorganismen und besonders Virusarten sehr tiefe Temperaturen ohne Schaden vertragen. So fand BARRAT (1) das Tollwutvirus in Gehirnschubstanz nach 3-monatigem Aufenthalt in flüssiger Luft noch infektiös. Nach Einwirkung einer Temperatur von -185°C auf das zerkleinerte und aufgeschwemmte Material war jedoch das Virus abgetötet.

SANDERSON (2) benutzte für Gefrierversuche einen Staphylokokken- und einen Coliphagen. Er fand keine Beeinflussung des Titters dieser Phagen durch 20-maliges Einfrieren und Auftauen. Als Kältequelle diente Kohlensäureeis.

D'HÉRELLE (3) arbeitete mit Dysenterie- und Staphylokokkenphagen. Waren diese weniger als 17 Tage alt, so konnten sie dreimaligem Einfrieren in flüssiger Luft für jeweils 10 Minuten widerstehen. Filtrate anderer, älterer Phagen wurden durch diese Behandlung geschädigt.

Zur Klärung der Frage, ob Virus lebendes oder totes Material sei, stellte RIVERS (4) 1927 zahlreiche Gefrierversuche mit verschiedenen Virusarten, Bakterien, Komplement und Trypsin an. Schädigte die Kälteeinwirkung das fragile Material, so war man damals geneigt, es der belebten Natur zuzurechnen. RIVERS stellte fest, daß die Bakteriophagen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen inaktiviert werden. Der Grad der Schädigung hing von der Verdünnung der Phagen in den verwendeten Lösungsmitteln ab. Verdünnungen von 1 : 1000 zeigten stärkeren Aktivitätsverlust als Verdünnungen von 1 : 10. Dabei wurden Lösungen mit Bouillon und destilliertem Wasser weniger geschädigt als solche mit physiologischer Kochsalzlösung und Locke-Lösung.

Derselbe Forscher wies weiter nach, daß das Virus III der Kaninchen durch wiederholtes Einfrieren bei etwa -60°C und Auftauen inaktiviert wird, während das Vaccine-Virus bei gleicher Behandlung keine offensichtliche Beeinflussung zeigt. Nach 12-maliger Kälteeinwirkung war noch kein Titerverlust nachzuweisen. Erst nach 34 Gefrierprozessen wurde das Vaccine-Virus in einer Verdünnung von 1 : 10 000 abgetötet. Seine Versuche mit dem Herpes-Virus sprachen ebenfalls für eine Inaktivierung dieses Virus bei der Verwendung von Locke-Lösung als Verdünnungsflüssigkeit.

NANTEL (5) untersuchte das Verhalten des Osttyps der amerikanischen Pferdeencephalitis (E.E.E.-Virus). Er verwendete destilliertes Wasser und physiologische Kochsalzlösung als Extraktionsmittel. Nach dem Einfrieren bei -40°C achtete er besonders auf den Einfluß der Auftaugeschwindigkeit. Auch bei unterschiedlicher Behandlung erhielt er annähernd die gleichen Titer, wobei diese bei physiologischer Kochsalzlösung höher lagen als bei destilliertem Wasser. Titerverluste durch den Gefrierprozeß konnten nicht erwiesen werden, weil Kontrollversuche mit unbehandeltem Virus fehlten. Gesichert jedoch war die Feststellung, daß die Auftaugeschwindigkeit keinen Einfluß auf den Titer ausübt.

Gefrierversuche mit weiteren Virusarten stellten TYRRELL und HORSEFALL (6) an. Sie arbeiteten mit den Influenzastämmen A — PR 8 und B Lee sowie mit dem Mumps- und dem Newcastle-Virus. Durch häufig wiederholtes Einfrieren und Auftauen zerlegten sie diese Virusarten in kleinere Teile. Sie erhielten als nachweisbare Virusbestandteile komplementbindendes Antigen und lösliches interferenzauslösendes Material, während die hämagglutinierende Fähigkeit, die enzymatische Aktivität und die Infektiosität dieser Virusarten durch den häufigen Gefrierprozeß verloren gingen. Schon nach 2-maliger Kälteeinwirkung war ein Sinken des Grades der Infektiosität feststellbar.

Bei intensiver Erforschung des MKS-Virus fand man bald, daß niedrige Temperaturen die Haltbarkeit erhöhen. Nach LÖFFLER und FROSCH (7) war keimfrei filtrierte MKS-Lympe im Eisschrank 8 Monate lang infektiös. ROUX, VALLÉE, CARRÉ und NOCARD (8) berichteten 1921, daß Proben von defibriniertem Blut MKS-infizierter Rinder bei einer Temperatur von -1° bis -2°C noch nach 3 Monaten aktiv waren. STOCKMAN und MINETT (9) fanden, daß das MKS-Virus in unverdünnter Meerschweinchenlymphe nach einer Aufbewahrung von 190 Tagen im Kühlschrank noch nicht abgetötet war. Bei 0° bis -4°C hielten sich Filtrate von Meerschweinchenlymphe, die in m/25 Phosphatpuffer gelöst waren, 12 bis 18 Monate lang, wobei allerdings ein merklicher Titerabfall festzustellen war.

Die englische MKS-Kommission stellte zahlreiche Versuche an, um die Wirkung der Kälte auf das MKS-Virus zu ermitteln. Die Ergebnisse wurden in ihrem 4. Bericht 1931 von GALLOWAY (10) veröffentlicht. Sein Interesse galt besonders den phosphatgepufferten Viruslösungen. Der Phosphatpuffer erwies sich für die Haltbarkeit bei Zimmertemperatur am besten geeignet. Bei diesen Versuchen blieben Aphthendecken von Meerschweinchen in m/25 Phosphatpuffer 90 Tage infektiös ohne merklichen Titerverlust. Die Aphthendecken wurden im Kühlschrank bei 4° C gehalten und von Zeit zu Zeit in Kältemischungen von -18° bis -20° C gebracht. Proben in physiologischer Kochsalzlösung blieben sowohl bei 4° C als auch bei -20° C, Viruslösungen 1 : 10 in m/25 Phosphatpuffer jedoch nur bei 4° C infektiös. Letztere wurden gegen alle Erwartung durch das Gefrieren bei -20° C inaktiviert. Die Schädigung war auf die Anwesenheit des Phosphatpuffers zurückzuführen, denn den Lösungen zugesetzte Farbindikatoren zeigten in gefrorenem Zustande eine Säuerung an. Diese Reaktionsänderung trat nicht allmählich, sondern plötzlich ein. MARTIN (10) löste das Rätsel mit folgender Erklärung: "Suppose 100 cc of m/15 phosphate saline (Na_2HPO_4 8,5 parts and KH_2PO_4 1,5 parts) with pH 7,5. From 0° to -5° C H_2O separates as ice; about 35 cc would separate. At -5° C a saturated solution of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ will freeze out, leaving excess of KH_2PO_4 , which is present in much less concentration and is 7 times as soluble at 0° C Na_2HPO_4 ."

MINETT (10) studierte das Verhalten des MKS-Virus im Fleisch geschlachteter Tiere. Bei häufigem Temperaturwechsel zwischen -18° und 20° C blieb das MKS-Virus im Fleisch und im Knochenmark während einer Spanne von 6 Tagen infektiös.

Die englische MKS-Kommission schloß aus ihren umfassenden Versuchen, daß das Einfrieren und Auftauen keinen oder nur geringen Einfluß auf den Titer des MKS-Virus habe, wenn virulentes Blut oder Lymphvirus 1 : 10 verdünnt mit physiologischer Kochsalzlösung oder Leitungswasser eingefroren wird. In manchen Versuchen wurden die Proben bis zu 70mal eingefroren ohne Abfall des Titers. Dabei waren aber die angegebenen Titer im allgemeinen nicht sehr hoch, z. B. 1 : 50 bei Gefrierversuchen mit Leitungswasser und physiologischer Kochsalzlösung, 1 : 1000 bei 70maligem Einfrieren und 1 : 40 beim Studium des Verhaltens im Fleisch geschlachteter Tiere.

RÖHRER, MÖHLMANN und PYL (11) führten 1949 mit Rinderaphthen vom MKS-Typ 0 Gefrierversuche aus. Das Ausgangsmaterial hatte einen Titer von 10^{-9} . Es wurde nachts bei -40° C und bei Tage bei 4° C gehalten, also täglich aufgetaut. Der Titer hielt sich 90 Tage bei 10^{-8} , war aber nach 129 Tagen auf 10^{-4} gesunken. Sie folgerten, daß das MKS-Virus bei -40° C lange Zeit haltbar ist.

Alle diese Versuche geben jedoch noch kein in jeder Hinsicht befriedigendes Bild über das Verhalten des MKS-Virus beim Einfrieren und Auftauen. Es ist zum Beispiel von Interesse, welchen Einfluß die Geschwindigkeit der Temperaturänderung auf das MKS-Virus ausübt. Außerdem bedarf die Frage der Klärung, wie stark das Virus durch ein- und mehrmaliges Einfrieren geschädigt wird, ob hierbei Unterschiede zwischen verschiedenen Medien bestehen und welche Faktoren bei der Schädigung des Virus durch Einfrieren und Auftauen maßgebend sind. Ziel der vorliegenden Versuche war es daher hauptsächlich, Lösungsmittel zu finden, in deren Gegenwart das MKS-Virus beim Einfrieren wenig oder gar nicht geschädigt wird und die deshalb für die praktische Anwendung beim experimentellen Arbeiten mit MKS-Virus und auch bei der Impfstoffproduktion empfohlen werden können.

Materialien und Methoden

Virus: Zu sämtlichen Versuchen wurde die an Säuglingsmäuse adaptierte MKS-Variante 0₁ verwendet. Das Virus hatte zuvor 28 Passagen der Mäuse durchlaufen. Während der Arbeit erreichte das Virus die 37. Passage. Es wurde also nur Virusmaterial von der 28. bis 37. Passage benutzt. Dieses Material wurde in Form ganzer Säuglingsmäuse in der Kühltruhe bei -23°C vorrätig gehalten. Das Einfrieren dieser Mäuse erfolgte kurz nach dem Absterben. Unter diesen Umständen ist anzunehmen, daß sich die Eigenschaften dieses Virus im Verlauf der Versuche nicht wesentlich geändert haben.

Virusgewinnung: Bei Bedarf wurden die eingefrorenen Mäuse bei Zimmertemperatur aufgetaut. Die steril entnommene Skelettmuskulatur und das Herz dienten zur Virusgewinnung. Mit sterilem Sand wurde das virus-haltige Material sorgfältig im Mörser zerrieben, 1 : 10 mit der jeweils zu prüfenden Flüssigkeit (Puffer oder sonstiges Medium) aufgenommen, 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen/Minute in einer Stockzentrifuge ausgeschleudert und danach der Überstand im Eisbad gehalten.

Mäuse: Zur Titrierung der Infektiosität dienten 4 bis 8 Tage alte, säugende Mäuse. Sie entstammten der anstaltseigenen, ektromeliefreien Zucht.

Medium: Geprüft wurde eine Reihe von Puffersystemen für den schwach sauren, den neutralen und den schwach alkalischen Bereich. Die Lösungen wurden nach den Angaben in den nachstehend benannten Schriften hergestellt: 1. Histochemische Methoden, eine Sammlung, herausgegeben von Walter Lipp, R. Oldenbourg — München. 2. Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse von Hoppe-Seyler, Thierfelder, 10. Auflage. 3. Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch von Prof. Dr. Karl Hinsberg und Prof. Dr. Konrad Lang, Urban und Schwarzenberg.

Aus vorrätig gehaltenen Stammlösungen wurde am Vortage des Versuches der Puffer auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, im Autoklaven sterilisiert und danach im Kühlschrank gehalten, so daß er bei der Verwendung eine Temperatur von 4°C aufwies.

pH-Messung: Zur genauen Ermittlung des pH-Wertes bedienten wir uns eines mit einer Glaselektrode ausgestatteten Meßgerätes der Firma Metrohm, Herisau — Schweiz. Damit ließ sich auch die Wasserstoffionen-Konzentration infektiösen Materials bestimmen. Bei den vorliegenden Versuchen wurde der pH-Wert des Puffers beim Einstellen, nach der Sterilisation und nach der Verreibung mit 10 % Virusmaterial gemessen. Vor jeder pH-Bestimmung wurde die Temperatur des Puffers festgestellt und das Gerät entsprechend reguliert.

Bestimmung der Viskosität: Die Viskosität wurde indirekt gemessen. Dazu diente ein Viskosimeter nach Höppler, VEB-Prüfgerätewerke Medingen/Dresden. Die dabei zu ermittelnde Fallzeit einer Kugel wurde mit einer Stoppuhr verfolgt und aus 5 Messungen der Mittelwert errechnet. Ein Satz von Aerometern, die auf 20°C geeicht waren, stand zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes der Flüssigkeiten zur Verfügung. Nach angegebener Formel wurde dann die Viskosität berechnet. Die Maßeinheit derart bestimmter Viskosität ist ein Centipoise. Mit Hilfe eines Ultrathermostaten (Thermomix, Fa. Braun, Melsungen) und Zusatz von Eisstücken wurde Wasser konstant auf 20°C gehalten und durch das Viskosimeter gepumpt.

Kältequellen: Zur Erreichung einer Temperatur von -20°C wurden in einem Dewar-Gefäß Eis, Kochsalz und Alkohol gemischt. Die erforderlichen

Mengen wurden empirisch ermittelt. Für Temperaturen von -65°C bis -70°C eignete sich Kohlensäure-Trockeneis, in Aceton gelöst und ebenfalls in ein Dewar-Gefäß gefüllt. Die Kältegrade wurden mit einem Alkoholthermometer von 30° bis -100°C gemessen.

Technik des Einfrierens: Die einzufrierenden virushaltigen Proben wurden in kleine Zentrifugenröhrchen gefüllt, die sich den krassen Temperaturänderungen gegenüber als sehr widerstandsfähig erwiesen. Es wurden 3 bis 5 ccm Flüssigkeit eingefüllt, die Röhrchen mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen und solange in die Kältemischung eingetaucht, bis sie die gleiche Temperatur hatten wie die Umgebung. Die Zeitdauer wurde an Kontrollröhrchen mit einer gleichen Menge derselben Flüssigkeit ohne Virus, in die ein Thermometer eingetaucht war, bestimmt. Mit der Stoppuhr wurde gemessen, wie lange es dauerte, bis die Kontrollthermometer und die Thermometer der Kältemischungen denselben Temperaturgrad anzeigten.

Das Auftauen der Gefrierproben erfolgte entweder bei 4°C im Kühlschrank, bei 22°C Zimmertemperatur oder bei 37°C im Wasserbad, das mit einem Thermomixgerät bei konstanter Temperatur gehalten wurde. Die Proben blieben nur bis zum vollständigen Auftauen bei der betreffenden Temperatur und wurden dann sofort in Eiswasser gebracht.

Titration der Infektiosität: Der Infektiositätstiter wurde bei allen Versuchen einerseits bei den eingefrorenen und aufgetauten Proben, andererseits zur Kontrolle bei derselben Viruslösung, die während der Versuchsdauer bei 4°C gehalten worden war, bestimmt. Die Proben wurden jeweils in dem zu prüfenden Medium nach Zehnerpotenzen verdünnt. Für jede neue Verdünnungsstufe benutzten wir eine frische Pipette. Bis zu der noch am gleichen Tage erfolgenden Verimpfung auf Säuglingsmäuse wurden die Röhrchen im Eisbad oder bei etwa 4°C im Kühlschrank gehalten. Von jeder Verdünnungsstufe im Bereich des vermuteten Infektionstiters wurden durchschnittlich 5 Jungmäusen je 0,1 ccm mit Hilfe einer 1 ccm-Spritze und einer Kanüle Nr. 20 intraperitoneal injiziert. Die Versuchstiere beobachteten wir 4 Tage lang. Die Todesfälle traten vor allem von der 24. bis zur 48. Stunde nach der Injektion auf. Die LD_{50} wurde nach der Methode von REED und MUENCH (12) berechnet. Starben Tiere während der ersten 12 Stunden oder wurden sie in dieser Zeit von ihren Müttern aufgefressen, so galten sie als interkurrente Ausfälle.

Versuchsverlauf: Beim Experimentieren mit MKS-Virus spielt die Zeit eine wesentliche Rolle. Es war deshalb erforderlich, einen einheitlichen Verlauf der Versuche und schonendste Behandlung des Virus außerhalb der Gefrierprozesse anzustreben. Nach einigen Vorversuchen wurde folgendes Verfahren, welches im Laufe eines Tages durchgeführt werden konnte, beibehalten:

Die virushaltige Muskulatur, die über Nacht im Kühlschrank gehalten worden war, wurde zuerst in einem Mörser mit Sand zerrieben, dann mit der entsprechenden Flüssigkeit 1 : 10 versetzt und zentrifugiert. Um zu vermeiden, daß Fett, welches in dünner Schicht den Überstand bedeckte, in die zu gewinnende Flüssigkeit gelangte, wurde diese mit einer Kapillarpipette abgesaugt. Danach wurden die vorgesehenen Verdünnungen hergestellt, von diesen, meist bei 10^{-4} beginnend die Gefrierproben entnommen und davon je 3 bis 5 ccm in kleine Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Die Zahl der Röhrchen für jede Stufe wechselte je nach der Vielzahl der Temperaturbedingungen. Nach der Herstellung der verschiedenen Kältegemische unterwarfen wir die Röhrchen dem Gefrierprozeß.

Anschließend wurden die unbehandelten, bei 4° C gehaltenen Kontrollverdünnungen und danach die aufgetauten Gefrierproben auf Mäuse verimpft, wobei die kältebehandelten Proben erst unmittelbar vor der Verimpfung verdünnt wurden. Zuletzt wurde der pH-Wert der Virusverdünnungen gemessen.

Eigene Versuche

Bei der Durchführung der Arbeit bestand das Bestreben, einerseits auf den erzielten Ergebnissen die folgenden Versuche aufzubauen und andererseits die vorhergehenden Versuche dadurch zu kontrollieren. Es wurde immer nur mit einem Puffer gearbeitet und dieser eingehend nach verschiedenen Richtungen untersucht. War eine Eigenschaft des Virus hinlänglich geklärt, so wurden bei den folgenden Experimenten Nachprüfungen in vereinfachter Weise angestellt.

Tabelle 1

Versuch mit isotonischem Azetat-Veronalpuffer bei verschiedener Viruskonzentration

Temperaturgrade (°C)		pH	Eingefrorene Virus- verdünnung	Titerwerte — log (LD ₅₀)	
Gefrieren	Auftauen			nach Einfrieren und Auftauen	Kontrolle (+4° C)
—65	+20	7,6	10 ⁻¹	6,5	6,5
—65	+20	7,6	10 ⁻³	6,0	6,5
—20	+37	6,8	10 ⁻¹	6,5	7,1
—20	+37	6,8	10 ⁻³	6,0	7,1

So konnte von einer Reihe von Puffern die Verwendbarkeit für Gefrierversuche mit MKS-Virus ermittelt werden. Dabei ergaben sich auch einzelne Hinweise auf die Vorgänge bei der Zerstörung des MKS-Virus durch Einfrieren und Auftauen.

1. Veronal-Puffer: Das Veronal puffert über einen ziemlich breiten pH-Bereich. Es bestand die Vermutung, daß veronalgepufferte Medien für Gefrierversuche mit dem MKS-Virus gut geeignet seien. Zunächst wurden Versuche mit dem isotonischen Azetat-Veronal-Puffergemisch nach Michaelis angestellt, um die Bedeutung der Geschwindigkeit der Temperaturänderung zu klären. Im ersten Versuch wurden Proben einer 10 %igen Viruslösung (pH 8,3) bei —20 bzw. —65° C eingefroren und bei +4, +20 bzw. +37° C im Wasserbad aufgetaut. Unter diesen Bedingungen wurde ein signifikanter Titerverlust gegenüber dem Kontrollmaterial nicht festgestellt, ein Ergebnis, das durch zahlreiche andere Versuche (s. auch folgende Tabellen) immer wieder bestätigt wurde, so z. B. durch 4 weitere Experimente, die bei verschiedenen pH-Werten (8,3; 7,6; 6,8 und 6,0) durchgeführt wurden. Während bei pH 7,6 und 8,3 durch das Einfrieren und Auftauen bei den genannten Temperaturgraden keine Aktivitätsverluste entstanden, fiel der Titer bei pH 6,8 im Mittel um eine halbe Zehnerpotenz von 10⁻⁷ auf 10^{-6,5}. Bei pH 6,0 verlor das Virus sowohl in den Gefrierproben als auch in den Kontrollen seine Infektiosität, was die alte Erfahrung bestätigt, daß das MKS-Virus bei einem pH von 6,0 in kurzer Zeit inaktiviert wird.

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit Proben verschiedener Viruskonzentration (10⁻¹ bzw. 10⁻³) durchgeführt, wobei wiederum die pH- und die

Tabelle 2

Versuch mit Veronalnatrium-Puffer verschiedener Molarität

Temperaturgrade (° C)		pH	Molarität m/x	Titer — log (LD ₅₀)			
Gefrieren	Auftauen			Eingefr. Virusverdünnungen			Kontrolle
				10—5	10—6	10—7	
—65	+20	7,5	15	7,0	6,7	6,5	7,3
		7,6	25	6,6	6,7	6,5	7,1
		7,5	50	6,6	6,5	<6,0	7,1
		7,6	90	6,5	6,5	<6,0	7,3
		7,6	180	6,3	5,8	<6,0	7,0
		8,0	∞	5,0	<5,0	<5,0	7,3

Temperaturbedingungen weitgehend wechselten. Der Versuch ist in Tabelle 1 verzeichnet.

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß bei optimalem pH von 7,6 das Virus in der Verdünnung von 10⁻¹ keinen Titerverlust erlitt, wogegen sich der Endtiter der Virusverdünnung von 10⁻³ von 10^{-6,5} auf 10⁻⁶ verringerte. Bei pH 6,8 fiel der Titer der Virusverdünnung von 10⁻¹ um eine halbe, der der Verdünnung von 10⁻³ sogar um eine ganze Zehnerpotenz. Dieser Versuch gab demnach einen Hinweis darauf, daß bei Gefrierversuchen neben dem pH des Mediums auch die Viruskonzentration eine Rolle spielt. In den nun folgenden Versuchen wurden deshalb nur noch stark verdünnte Viruslösungen (10⁻⁴ bis 10⁻⁷) eingefroren. Bei der Berechnung der LD₅₀ wurden, wenn der Endpunkt nicht erreicht war, die nächst niederen Verdünnungsstufen, die ebenfalls eingefroren waren, einbezogen. Die in den Tabellen verzeichneten Titerwerte beziehen sich immer auf das Ausgangsmaterial (Gewebe) und sind der Kürze wegen als die negativen Logarithmen der die LD₅₀ darstellenden Virusverdünnungen angegeben.

Die Versuche wurden mit dem Veronalnatrium-Puffer fortgeführt.

Als weitere, für den Gefrierversuch vielleicht wichtige Eigenschaft wurde bei diesem Puffer auch die Molarität berücksichtigt. Für die pH-Einstellung eines m/15-Puffers waren die Daten in Puffertabellen gegeben. Bei den anderen Pufferkonzentrationen erfolgte die Verdünnung mit CO₂-freiem Wasser bis zur gewünschten Molarität, wobei sich der pH-Wert durchweg auf gleicher Stufe hielt. Mit der Verdünnung des Puffers nimmt aber die Pufferkapazität ab. Als ungepufferte Kontrolle diente Aqua dest., das mit n/10 NaOH auf pH 8,0 eingestellt worden war.

Tabelle 2 zeigt einen Vergleichsversuch dieser Art, bei welchem lediglich die Molarität variierte, die Temperatur von —65° C bzw. 20° C sowie der pH-Wert von 7,6 jedoch konstant gehalten wurden. Aus ihr ist ein steigender

Tabelle 3

Versuch mit Universal-Veronalpuffer nach Michaelis

Temperaturgrade (° C)		pH	— log (LD ₅₀)			
Gefrieren	Auftauen		Eingefr. Virusverdünnungen			Kontrolle
			10—5	10—6	10—7	
—20	+20	8,0	7,0	6,8	6,5	7,2
—65	+37	8,0	7,0	6,7	6,6	7,2

Titerverlust mit zunehmender Verdünnung des Puffers nach einmaligem Einfrieren zu erkennen. Zum gleichen Ergebnis führten gleichzeitig ausgeführte Versuche mit einer Einfriertemperatur von -20°C und einer Auftautemperatur von $+20^{\circ}\text{C}$.

In dem in Tabelle 3 wiedergegebenen Versuch wurde der Universal-Veronalpuffer nach MICHAELIS, der in dem pH-Bereich von 2,0 bis 10,0 puffernd wirkt, bei pH 8,0 und verschiedenen Virusverdünnungen geprüft.

Aus der Tabelle ist bei der Virusverdünnung von 10^{-5} ein nur unbedeutender, bei 10^{-7} jedoch ein deutlicher Virusverlust gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß auch bei diesem Puffergemisch das MKS-Virus durch das Einfrieren und Auftauen geschädigt wurde, wobei wiederum die Schädigung mit der Virusverdünnung zunahm.

Tabelle 4

Versuche mit Glykokollpuffer nach Sørensen

Temperaturgrade (° C)		pH	— log (LD ₅₀)			
Gefrieren	Auftauen		Eingefr. Virusverdünnungen			Kontrolle
			10 ^{−5}	10 ^{−6}	10 ^{−7}	
−20	+22	8,5	7,1	6,8	7,0	6,8
	+37	8,5	6,8	7,0	7,0	6,8
−65	+22	8,5	7,0	7,0	7,0	6,8
	+37	8,5	7,0	7,0	7,0	6,8
−20	+22	9,5	5,0	<5	<5	7,0
	+37	9,5	5,3	<5	<5	7,0
−65	+22	9,5	5,3	<5	<5	7,0
	+37	9,5	5,1	<5	<5	7,0
−65	+37	8,0	7,0	7,0	7,0	7,0
−20	+37	9,0	6,8	6,5	6,2	7,0

Über die verschiedenen Veronalpuffer läßt sich noch folgendes sagen: Diesen Puffern zugesetzte Farbindikatoren (Merck, pH 5,4 bis 7,0) zeigten in gefrorenem Zustand keine Säuerung an. Die beobachtete Schädigung des Virus kann demnach nicht durch ein ungünstiges pH verursacht worden sein.

Der isotonische Azetat-Veronalpuffer zeigte bei Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C schon nach 2 Tagen ein Präzipitat und wurde trübe. Diese Pufferlösung erscheint schon deshalb nicht brauchbar.

Zu beobachten war ferner eine narkotisierende Wirkung des Veronals auf die Säuglingsmäuse. Nach der intraperitonealen Injektion von 0,1 ccm Puffer saugten die Mäuse nicht mehr, sondern fielen in Bewegungslosigkeit und tiefen Schlaf, der ungefähr 2 bis 3 Stunden dauerte. Todesfälle traten dadurch zwar nicht ein, aber die Mütter neigten mehr dazu, die bewegungslosen Mäuse aufzufressen, was seltener der Fall war, wenn die jungen Mäuse nach der Injektion weitersaugten.

Die Anwendungsmöglichkeiten der Veronalpuffer bei Arbeiten mit dem MKS-Virus werden also stark eingeengt.

2. Glykokoll-Puffer: Der Glykokoll-Puffer nach SÖRENSEN besitzt seine höchste Pufferkapazität zwischen pH 9,0 und 10,0. Doch gelingt es auch bis pH 7,8, einen bestimmten, gewünschten pH-Wert einzustellen. Der Puffer

Tabelle 5

Versuche mit Glykokollpuffer verschiedener Molarität

Temperaturgrade (° C)		pH	Molarität m/x	— log (LD ₅₀)			
Ge- frieren	Auf- tauen			Eingefr. Virusverdünnungen			Kontrolle
				10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
—65	+37	8,0	10	7,0	7,0	7,0	7,0
		8,5	25	7,1	7,3	7,0	7,3
		8,5	50	7,3	7,3	7,3	7,5
		8,5	90	7,2	7,2	7,0	7,2
		8,5	180	6,8	6,8	7,1	7,1

wurde für die vorliegenden Versuche hauptsächlich zwischen pH 8,0 und 9,0 verwendet und diente außerdem dazu, die pH-Stabilität des MKS-Virus im alkalischen Bereich beim Einfrieren und Auftauen zu ermitteln.

Die in Tabelle 4 zusammengefaßten Versuche klärten das Verhalten des MKS-Virus im alkalischen Bereich.

Aus den Versuchen geht klar hervor, daß bis pH 8,5 auch stark verdünntes MKS-Virus nicht geschädigt wurde. Während der Titer bei pH 9,0 um durchschnittlich eine halbe Zehnerpotenz fiel, betrug der Virusverlust bei pH 9,5 schon mehr als 2 Zehnerpotenzen. Die Kontrollen hielten bei 4° C ihren Titer. Das Virus wird also im Bereich über pH 9,0 zunehmend inaktiviert.

Zur Ermittlung des Einflusses der Pufferkonzentration wurden auch verschieden molare Verdünnungen geprüft. Die Tabelle 5 zeigt das Ergebnis einer solchen Vergleichsprüfung.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist insofern bemerkenswert, als auch bei einer 180-fachen Verdünnung des molaren Puffers das Virus nach einmaligem Einfrieren und Auftauen höchstens geringfügig geschädigt wurde. Zu demselben Ergebnis führten gleichzeitig angestellte Versuche mit —20° C Einfrier- und 20° C Auftautemperatur.

Als weitere Lösung wurde der isotonische Puffer nach HINSBERG-LANG, dessen puffernde Eigenschaften ebenfalls auf Glykokoll beruhen, geprüft. Sein pH-Wert beträgt 7,8, der sich beim Sterilisieren durch Hitze auf pH 8,4 erhöhte. Bei den vorliegenden Versuchen wurde der Puffer deshalb mittels Seitz-Filtration ohne pH-Änderung keimfrei gemacht. Das Virus wurde zudem wiederholt bei —65° C eingefroren und bei 37° C im Wasserbad aufgetaut. Die Tabelle 6 gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 6

Versuche mit isotonischem Puffer nach Hinsberg-Lang

Temperaturgrade (° C)		Zahl der Gefrierprozesse	pH	— log (LD ₅₀)			
Gefrieren	Auf-tauen			Eingefr. Virusverdünnungen			Kontrolle
				10 ^{—5}	10 ^{—6}	10 ^{—7}	
—20	+ 4	1	7,8	7,1	7,1	7,1	7,1
	+37	1	7,8	7,1	7,1	6,9	7,1
—65	+ 4	1	7,8	6,9	7,1	6,9	7,1
		1	7,8	7,1	7,1	7,1	7,1
	+37	4	7,8	7,1	6,8	6,8	7,1
		8	7,8	6,8	6,7	6,5	7,1
		16	7,8	6,8	6,5	6	7,1

Einmaliges Einfrieren und Auftauen konnte das MKS-Virus ohne Schaden ertragen. Nach 8 und 16 Wiederholungen des Gefrierprozesses war jedoch eine deutliche Schädigung zu erkennen, die wieder bei den extremen Virusverdünnungen stärker war. Derart häufiges Einfrieren und Auftauen dürfte jedoch beim praktischen Arbeiten mit dem MKS-Virus nur ausnahmsweise notwendig sein.

Tabelle 7

Versuche mit weiteren Pufferarten für den schwach alkalischen Bereich sowie mit Rinder-Amnionflüssigkeit

Puffer	Temperaturgrade		Gefr.- Prozesse	pH	—log (LD ₅₀)			
	Gefr.	Auft.			Eingefr. Virusverdünnungen			Kon- trolle
					10— ⁵	10— ⁶	10— ⁷	
Borat-Puffer nach Holmes	— 65	+37	1	7,6 8,6	5,5 6,5	<5 6,0	<5 <6	7,2 7,0
Borax-Kalium- biphosphat-Puffer nach Kolthoff	— 65	+37	1	7,6	6,8	6,5	<6	7,0
Borsäure-Soda- Puffer nach Atkins und Pantin	— 65	+37	1	8,0	5,4	5,1	<5	7,1
	— 20	+37	1	8,0	6,0	6,0	5,5	7,1
Isotonischer Phosphat-Puffer nach Pyl	— 65	+37	1	8,0	7,3	7,5	7,3	7,5
			10	8,0	7,0	7,0	6,8	7,5
			20	8,0	6,8	6,5	6,0	7,3
Phosphat-Puffer nach Sörensen	— 65	+37	1	7,6	6,0	5,7	<5	6,8
Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung	— 65	+37	1	7,2	5,5	5,0	<5	7,2
Ringer-Locke-Tris- Lösung	— 20	+22	1	7,8	7,0	7,0	7,0	7,0
			1	7,8	7,0	7,0	7,0	7,0
	— 65	+37	4	7,8	6,9	6,4	6,0	7,0
			8	7,8	6,7	6,3	6,0	7,0
			16	7,8	6,5	6,0	<6,0	7,0
	— 65	+37	1	7,0 6,6	7,1 6,9	7,3 6,6	7,0 <6	7,1 7,3
Rinder- Amnionflüssigkeit	— 65	+37	1	8,3	7,0	6,6	6,5	7,3
	— 20	+22	1	8,3	7,0	6,7	6,5	7,3
	— 65	+37	10	8,3	6,5	6,3	6,0	7,3

Auf Grund dieser Versuche kann der Glykokoll-Puffer für Gefrierarbeiten mit MKS-Virus als brauchbar bezeichnet werden.

3. Borat-Puffer: Das Verhalten des MKS-Virus im Borat-Puffer nach HOLMES ist aus Tabelle 7 zu ersehen.

Hierbei sank der Titer bei einem pH-Wert von 7,6 um 2, bei pH 8,6 um 1 Zehnerpotenz schon nach einmaligem Einfrieren. Der Puffer ist also ungeeignet.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte der in derselben Tabelle verzeichnete Versuch mit Borax-Kaliumbiphosphat-Puffer nach KOLTHOFF. Auch hier ist, zumindest bei den Virusverdünnungen 10^{-6} und besonders 10^{-7} , ein deutlicher Virusverlust schon nach einmaligem Einfrieren und Auftauen zu erkennen.

Beide Puffersysteme wurden in gefrorenem Zustand sauer. Die Farbe des Indikators Merck wurde gelblich, während sie bei pH 7,0 und darüber blau ist.

In Anbetracht dieser Ergebnisse kann man beide Boratpuffer für Kältearbeiten mit MKS-Virus nicht verwenden.

4. Borsäure-Soda-Puffer nach ATKINS und PANTIN: In Gegenwart dieses Puffers wurde das MKS-Virus sogar im Bereich von pH 8,0 beim Gefrieren stark geschädigt (s. Tabelle 7). Er ist deshalb zur Kältekonservierung des Virus ungeeignet.

5. Isotonischer Phosphat-Puffer, hergestellt nach Angaben von PYL (13). Die Ergebnisse der Versuche mit diesem Puffer sind ebenfalls in Tabelle 7 zusammengefaßt. Hierbei war ein Virusverlust nach einmaligem Einfrieren überhaupt nicht festzustellen. Nach zehnmaligem Einfrieren war er kaum bemerkenswert und erst nach 20 Gefrierprozessen erfolgte ein Titerabfall um 1 Zehnerpotenz. Dieser Puffer erscheint deshalb für Gefrierversuche brauchbar.

6. Phosphat-Puffer nach SÖRENSEN: Das Verhalten des Phosphat-Puffers beim Einfrieren ist bereits weitgehend geklärt (10). Dennoch wurde damit ein Versuch durchgeführt, um diesen Puffer mit anderen Puffersystemen vergleichen zu können. Der Versuch ist ebenfalls in der Tabelle 7 wiedergegeben. Sie zeigt bereits bei einer Virusverdünnung von 10^{-5} einen deutlichen Virusverlust von einer Zehnerpotenz. Die Titerverluste entsprechen denen bei anderen, als für den Gefrierprozeß ungeeignet bezeichneten Puffern.

7. Phosphatgepufferte NaCl-Lösung: Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung wird häufig als Extraktionsmittel für Virus verwendet. Eine starke Schädigung des Virus ist auch hier unverkennbar (s. Tabelle 7). Die phosphatgepufferte NaCl-Lösung unterscheidet sich demnach wenig vom Phosphatpuffer.

8. Ringer-Locke-Tris-Lösung: Die puffernde Substanz dieser Lösung ist Trishydroxymethylaminomethan. Sie eignet sich gut als Zellkulturmedium (14) und wurde deshalb zu den vorliegenden Versuchen herangezogen.

Wie Tabelle 7 zeigt, trat bei einmaligem Einfrieren auch bei stark verdünntem Virus kein Titerverlust auf. Ein feststellbarer Titerabfall setzte erst nach 4-maligem Gefrieren ein und betrug nach 16 Gefrierprozessen ungefähr eine Zehnerpotenz. Dieses Ergebnis ist ungefähr gleich dem mit Glykokollpuffer erzielten Resultat.

Ein verhältnismäßig geringer Verlust von einer halben Zehnerpotenz trat bei dem Versuch mit pH 6,6 auf. Er liegt in einem besonderen Verhalten der puffernden Substanz begründet. Phenolrot war als Indikator zugesetzt. Seine Farbe ist unter pH 7 gelborange. In gefrorenem Zustand wurde der Farbindikator wieder hellrot, der Puffer also neutral bis schwach alkalisch. Daher ergaben sich bei dem eingestellten pH-Wert von 6,6 im Gegensatz zu anderen Puffern nur verhältnismäßig geringe Verluste. Der Wechsel in den alkalischen Bereich geht nicht allzu weit; denn über pH 8,0 zeigt Tris eine große Pufferkapazität, und die Substanz besitzt ein pH von 9,2 bis 9,4.

Auf Grund der durchgeführten Versuche ist der Tris-Puffer ebenso wie der Glykokoll-Puffer für Gefrierarbeiten mit MKS-Virus zu empfehlen.

9. Rinderamnionflüssigkeit: In der Gewebezucht besitzt die Rinderamnionflüssigkeit als Zellkulturmedium eine erhebliche Bedeutung. Aus diesem Grunde wurde sie in einem Versuch geprüft. Sie diente als Lösungsmittel für das MKS-Virus. Der pH-Wert der Rinderamnionflüssigkeit betrug 8,3. Mit einem Seitz-Filter war sie keimfrei gemacht worden. Das Ausmaß der Schädigung des Virus durch Einfrieren und Auftauen geht aus dem ebenfalls in Tabelle 7 registrierten Versuch hervor. Der Virusverlust betrug nach einmaligem Einfrieren in der äußersten Verdünnung von 10^{-7} ebenso wie nach zehnmaligem Einfrieren in der Verdünnung 10^{-5} eine halbe Zehnerpotenz. Wenn auch die Schädigung nicht übermäßig groß ist, so erscheint doch die Rinderamnionflüssigkeit für experimentelle Arbeiten mit dem MKS-Virus, sobald ein Einfrieren damit verbunden ist, nicht empfehlenswert.

Tabelle 8
Versuche mit viskositätssteigernden Mitteln

Medium	Zusatz		Viskosität (Centipoise)	—log (LD ₅₀)			Kontrolle	Mittl. Virusverlust (log LD ₅₀)
	Mittel	o/o		Eingefr. 10 ⁻⁵	Virusverdünnungen 10 ⁻⁶	10 ⁻⁷		
Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung	—	—	0,96	5,5	5,0	<5	7,2	>2,0
	Saccharose	3,8	1,2	6,5	6,7	6,5	6,5	0
	Saccharose	17	1,73	7,0	7,0	7,0	7,0	0
	Glycerin	10	1,3	5,8	5,6	<5	6,5	>1,0
m/90 Veronalnatrium	—	—	0,99	6,5	6,5	6,0	7,3	0,8
	Saccharose	5	1,13	7,0	7,0	7,0	7,3	0,3
	Saccharose	20	1,92	7,0	7,0	7,0	7,0	0
Aqua dest., mit n/10 NaOH auf pH 8,0 eingestellt	—	—	0,98	<5	<5	<5	7,3	>2,1
	Saccharose	10	1,31	6,5	6,5	6,0	7,3	1,0
	Saccharose	20	1,82	7,0	7,2	7,0	7,3	0,2
	Saccharose	20	1,82	7,0*	7,0*	7,0*	7,3*	0,3*

* nach 20maligem Einfrieren und Auftauen.

10. Versuche mit viskositätserhöhenden Mitteln: Glycerin und m/10 Phosphatpuffer zu gleichen Teilen werden als bestes Medium zur Konservierung von Virus empfohlen. THIERY und GIRARD (15) sowie PYL und MÖHLMANN (16) berichteten über Zusatz von Glycerin zur MKS-Vaccine mit der Absicht, die Haltbarkeit des Impfstoffes gegen mäßige Temperaturerhöhungen und Frosteinwirkungen zu verbessern. Bei einer Temperatur von -20°C verhindert ein 50 %iger Glycerinzusatz das Erstarren.

Bei den vorstehend beschriebenen eigenen Versuchen ergaben sich Hinweise dafür, daß noch weitere Faktoren das Verhalten des MKS-Virus beim Einfrieren und Auftauen bestimmen. Diesen Eindruck erweckte z. B. das Verhalten des Virus in verschiedenen konzentrierten Pufferlösungen im Vergleich mit dest. Wasser. Zu denken war u. a. an die Viskosität, die durch Messung erfaßbar ist. Sie wird z. B. durch Glycerinzusatz wesentlich erhöht, desgleichen durch Zusatz von Zuckerarten. MICHELSEN und MIKKELSEN (17) machten die Beobachtung, daß der Zusatz von Glukose oder Laktose zum Medium die Gefriertrocknung des MKS-Virus begünstigt. Dieselbe Erfahrung machte ungefähr gleichzeitig H. MIEHLER (18). MICHELSEN und MIKKELSEN setzten die

Zucker zu, um die Masse des Trocknungsgutes zu vergrößern. Viskosimetrische Messungen wurden anscheinend nicht vorgenommen.

Zur Klärung der Frage, welche Bedeutung der Viskosität zukommt, wurden einige Versuche angestellt. Als viskositätserhöhende Mittel dienten Glycerin und Saccharose. Durch verschieden hohen Zusatz dieser Mittel zu Puffersystemen, die für die Kältebehandlung des Virus ungeeignet waren, konnte die Wirkung der Viskosität mit Pufferung studiert werden. Der reine Einfluß der Viskosität ohne Pufferung wurde in der Weise geprüft, daß diese Mittel in dest. Wasser, welches mit $n/10$ NaOH auf pH 8,0 eingestellt worden war, gelöst wurden.

Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über diese Versuche. Bei gepufferter NaCl-Lösung wurde die Viskosität durch 3,8 % Saccharose von 0,96 auf 1,2 Centipoise erhöht. Aus den erhaltenen Titern ist zu ersehen, daß schon 3,8 % Saccharosezusatz die Verluste von durchschnittlich 1,9 Zehnerpotenzen bei phosphatgepufferter NaCl-Lösung verhindern konnte. Diese Wirkung übten 10 % Glycerin trotz gleicher Viskositätserhöhung nicht aus. Größere Mengen von Glycerin wurden nicht verwendet, weil solche auf die Mäuse toxisch wirken und die Ergebnisse verfälschen würden.

Setzte man dem $m/90$ Veronalnatrium-Puffer 5 % Saccharose zu, wodurch sich die Viskosität von 0,99 auf 1,13 erhöhte, so überstand das Virus darin den Gefrierprozeß ohne Schaden, während ohne diesen Zusatz ein durchschnittlicher Titerverlust von 0,8 Zehnerpotenzen entstand.

Eine Viruslösung in reinem Aqua dest. verlor ohne viskositätserhöhenden Zusatz über 2 Zehnerpotenzen. Mit einem Zusatz von 10 % Saccharose, durch welchen die Viskosität von 0,98 auf 1,31 stieg, erlitt das Virus bei einmaligem Einfrieren und Auftauen eine relativ geringe Schädigung von 0,9 Zehnerpotenzen. Ein Zusatz von 20 % Saccharose erhöhte die Viskosität auf 1,82 Centipoise, und das Virus überstand in einer solchen Lösung 20 Gefrierprozesse ohne Schaden.

Die Erhöhung der Viskosität der Lösungsmittel hat demnach, auch wenn diese gar nicht gepuffert sind, eine starke Schutzwirkung auf das Virus beim Einfrieren und Auftauen. Ein Zusatz von 5 % Saccharose zu gepufferten Lösungen oder 20 % zu ungepuffertem Wasser bewirkt eine den praktischen Bedürfnissen voll entsprechende Schutzwirkung.

Vergleichende Auswertung der Ergebnisse

Im vorstehenden Kapitel wurden die Versuche mit den einzelnen Lösungen beschrieben. Dabei haben sich verschiedene Gesichtspunkte ergeben, die einen gewissen Einblick in den Mechanismus der Virusschädigung beim Einfrieren und Auftauen ermöglichen. Es erscheint deshalb notwendig, die an den verschiedenen Medien gewonnenen Versuchsergebnisse von diesen Gesichtspunkten aus gesondert zu betrachten.

1. *Bedeutung der Geschwindigkeit des Einfrierens und Auftauens.* Zunächst soll der Einfluß der Geschwindigkeit der Temperaturänderung auf das Virus untersucht werden. Die Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Temperaturänderungen denen das Virus unterworfen wurde, und ihre Zeitdauer.

Die Unterschiede kommen besonders deutlich zum Ausdruck, wenn man die Änderungsfaktoren berechnet. Bringt man Zeitdauer und Grad der Temperaturänderung in Beziehung, so gibt der Bruch Zeit/Temperaturänderung die

Zahl der Minuten an, die für die Temperaturänderung um 1 Grad benötigt wurden. Die umgekehrte Beziehung ergibt die Zahl der Grade, um die sich die Temperatur in 1 Min. änderte. So fiel beim Einfrieren bei -20°C die Temperatur um 1°C , beim Gefrieren bei -65°C um 16°C in der Minute. Die beiden extremen Werte beim Auftauen sind Änderungen von $1/6^{\circ}\text{C}$ und 26°C in der Minute. In Wirklichkeit sinkt die Temperatur beim Einfrieren nicht gleichmäßig, sondern anfangs schneller und am Ende langsamer und steigt beim Auftauen in derselben Weise, weil das Temperaturgefälle geringer wird. Die angegebenen Zahlen sind die an verschiedenen Lösungen unter einheitlichen Bedingungen gemessenen Mittelwerte, die Vergleiche ermöglichen und für alle Versuche gelten. Deshalb konnte bei den einzelnen Versuchen auf die Zeitangabe verzichtet werden.

Tabelle 9

Gefrier- und Auftaugeschwindigkeit in verschiedenen Temperaturbereichen

Gefrier- temperatur	Auftau- temperatur	Zeitdauer (Min.)	Min. pro 1°C Änderung	$^{\circ}\text{C}$ Änderung pro Min.
-20°C		20	1	1
	+ 4°C	120	6	0,16
	+ 22°C	30	1,5	0,66
	+ 37°C	2	0,1	10
-65°C		4	0,06	16
	+ 4°C	150	2,3	0,44
	+ 22°C	45	0,7	1,44
	+ 37°C	2 $\frac{1}{2}$	0,04	26

In der Tabelle 10 sind die Titer der bei verschiedenen Temperaturen eingefrorenen und aufgetauten Viruslösungen eingetragen. Die wegen zu großer Virusverluste als unbrauchbar erkannten Medien wurden nicht eingehend studiert und deshalb in diese Tabelle nicht aufgenommen.

Die angegebenen mittleren Titerwerte wurden aus den Ergebnissen von 3, manchmal 4 Titrationen der einzelnen, verschieden konzentrierten Viruslösungen errechnet. Die Tabelle 10 zeigt, daß die Aktivitätsverluste, sofern solche überhaupt eintraten, ungefähr dieselben waren, gleichgültig, bei welcher Temperatur man einfrore und auftaute. Es liegen zwar kleine Unterschiede vor, die sich aber innerhalb der zu erwartenden Fehlerbreite bei biologischen Versuchen halten. Es erscheint deshalb der Schluß berechtigt, daß die Inaktivierung des MKS-Virus in den als brauchbar erkannten Medien von dem Ausmaß der Temperaturänderung, d. h. von der Geschwindigkeit des Einfrierens und Auftauens, praktisch unabhängig ist.

2. Die pH-Abhängigkeit. Die Haltbarkeit des MKS-Virus ist angeblich in erster Linie von dem pH-Wert des Lösungsmittels abhängig. Als pH-Optimum wurde von mehreren Forschern der pH-Wert von 7,5 bis 7,6 ermittelt (Pyl, Pyl und Klenk, Ruska-Menze, Schlögel, englische und amerikanische MSK-Kommissionen). Im alkalischen Bereich setzt oberhalb pH 11 ebenso wie im

schwach sauren Bereich unter pH 6,5 eine rasche Inaktivierung ein. Bei den vorliegenden Versuchen war zu ermitteln, ob und wie weit der pH-Wert beim Einfrieren und Auftauen auf die Virusstabilität von Einfluß ist. Zur Prüfung der pH-Abhängigkeit wurden nur Puffersysteme verwendet, die im optimalen Bereich keine oder nur eine minimale Schädigung des Virus beim Gefrieren bewirkten, im alkalischen Bereich vor allem der Glykokollpuffer, im schwach sauren der Veronalpuffer und die Ringer-Locke-Tris-Lösung.

Tabelle 10

Titerwerte ($-\log LD_{50}$) nach Einfrieren und Auftauen unter verschiedenen Bedingungen

Puffer	Molari- tät oder pH	Einfriertemperatur						Kon- trollen	Mittl. Virus- verlust (log LD ₅₀)
		—20° C			—65° C				
		Auftautemperatur (° C)							
		+4	+20	+37	+4	+22	+37		
Isotonischer Veronal- Acetatpuffer nach Michaelis	8,3	6,5	6,5	6,5	6,5	~7	6,8	6,5	0
	7,6	6,6	6,7	6,6	6,5	6,5	6,5	7,1	0,6
Veronal-Natrium	m/ 15		6,8	6,9		6,8	6,8	7,3	0,5
	m/ 50		6,6	6,5		6,4	6,5	7,1	0,6
	m/180		6,1	5,9		6,0	6,3	7,0	0,9
Isotonischer Puffer nach Hinsberg-Lang	8,2		7,1	7,1		6,9	7,1	7,1	0
Glykokollpuffer nach Sörensen	9,5		5,0	5,3		5,3	5,1	7,0	1,8
	8,5		7,0	6,8		7,0	7,0	6,8	0
	m/ 25		7,1	7,0		7,1	7,2	7,3	0,2
	m/ 50		7,2	7,3		7,3	7,2	7,5	0,2
Rinder-Amnion- flüssigkeit	8,3			6,7			6,6	7,3	0,6
Ringer-Locke-Tris- Lösung	7,8			7,0			7,0	7,0	0

Die Abbildung 1 zeigt die Titer nach einmaligem Einfrieren und Auftauen in den verschiedenen pH-Bereichen. Aus dem Kurvenverlauf ist zu sehen, daß nach dem Einfrieren und Auftauen in Pufferlösungen von pH 7,0 bis 9,0 kein oder nur ein unbedeutender Titerverlust nachweisbar war. In diesem Bereich des pH-Optimums bleibt demnach das pH des Mediums ohne Einfluß auf das Virus beim Einfrieren und Auftauen.

In Lösungen, die saurer als pH 6,5 oder alkalischer als pH 9,5 waren, stieg der Virusverlust aber schon beträchtlich. Die erhaltenen Virustiter nahmen nach der sauren Seite rasch, nach der alkalischen langsamer ab. Die unbehandelten Kontrollen hielten während der Zeit des Gefrierprozesses der Versuchsproben, der 2 bis 3 Stunden dauerte, im sauren Bereich bis pH 6,5 und im alkalischen Bereich bis pH 9,5 den Titer von 10^{-7} . Der Titerverlust ist in diesem Grenzbereich deshalb auf das Einfrieren und Auftauen zurückzuführen und steigt um so mehr, je weiter sich der pH-Wert vom Stabilitäts optimum entfernt.

Überblickt man die Kurve, so fällt auf, daß in der Mitte der Stabilitätszone der pH-Wert 8,0 liegt. Der Glykokoll-Puffer sowohl als auch die mit Tris gepufferte Lösung besitzen bei pH 8,0 eine höhere Pufferkapazität als bei pH 7,5. Außerdem ist die Gefahr einer Säuerung durch die Kohlensäure der Luft größer als ein umweltbedingtes Ansteigen in den alkalischen Bereich. Auch hat virushaltiges Material wie Aphthendecken oder Muskulatur natürlicherweise einen pH-Wert von 7,0 bis ungefähr 6,8, der einen Puffer zur sauren Seite hin beeinflußt. Aus diesen Gründen erscheint für die Aufbewahrung des Virus, besonders wenn es eingefroren wird, ein pH von 8,0 am vorteilhaftesten. Es wurde deshalb bei den vorliegenden Versuchen mit Vorliebe verwendet.

3. Die Abhängigkeit der Schädigung von der Molarität verschiedener Puffer. Zur Klärung der Frage, ob und wie weit sich die Molarität eines Puffers auf das Virus beim Gefrierprozeß auswirkt, wurden der Veronalnatrium-

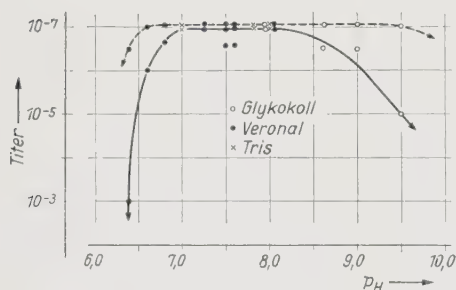


Abb. 1. Titer in verschiedenen pH-Bereichen nach einmaligem Einfrieren und Auftauen (—) im Vergleich zu den Titern ohne Einfrieren (Kontrollen — — —)

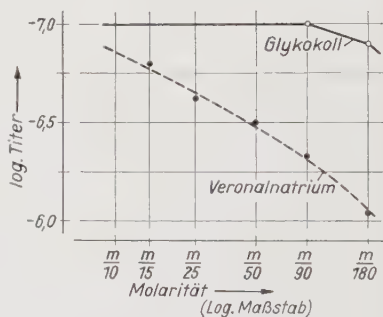


Abb. 2. Beziehungen zwischen Molarität und Titerabfall nach Einfrieren und Auftauen bei Veronalnatrium-Puffer nach Michaelis und Glykokoll-Puffer nach Sørensen

Puffer nach MICHAELIS und der Glykokoll-Puffer nach SÖRENSEN in verschiedenen molaren Verdünnungen untersucht. Mit geringer Molarität sinkt entsprechend auch die Pufferkapazität.

Wie aus der Abbildung 2 zu ersehen ist, sind die Titer in der konzentrierten Veronal-Pufferlösung wesentlich höher als in der verdünnten. Der Titerverlust beim Veronalpuffer hängt also deutlich von dessen Konzentration ab.

Beim Glykokoll-Puffer ist jedoch noch bei einer 180fachen Verdünnung des molaren Puffers kein Einfluß der Konzentration zu erkennen. Eine direkte Schädigung des Virus durch den Gefrierprozeß ist bei ihm also nicht festzustellen. Dieses Ergebnis beweist, daß beim Glykokoll-Puffer die Puffer-Konzentration keinen wesentlichen Einfluß auf den Titerverlust beim Einfrieren und Auftauen von MKS-Virus hat.

Zur weiteren Klärung dieses auffallenden Unterschiedes zwischen den beiden Puffern wurden die untersuchten Puffersysteme, die beim Gefrierprozeß nicht sauer werden, verglichen. Dabei ließ sich die Pufferkapazität indirekt ermitteln anhand der pH-Änderungen, die ein Puffersystem beim Zusatz einer 10 %igen Muskulaturverreibung erfährt. In Tabelle 11 wurden zum Vergleich die so ermittelten pH-Werte vor und nach dem Sterilisieren sowie die pH-Werte der 10 %igen virushaltigen Muskulaturverreibung eingetragen. Der

pH-Wert der Muskulatur von Säuglingsmäusen lag, wie an Verreibungen mit Aqua dest. gemessen wurde, zwischen 7,0 und 6,8.

Aus der Tabelle 11 geht hervor, daß sich der pH-Wert mit abnehmender Molarität durch Sterilisieren und Viruszusatz zunehmend verschiebt. Beim Glykokoll-Puffer, dem isotonischen Phosphatpuffer, der Ringer-Locke-Tris-Lösung und dem Puffer nach HINSBERG-LANG sind die pH-Verschiebungen beträchtlich. Z. B. fiel das pH des m/180 Glykokoll-Puffers durch den Viruszusatz von 8,5 auf 7,2, also um 1,3 Potenzen. Trotz dieser offensichtlich geringen Pufferkapazität war ein Titerverlust nicht festzustellen. Andererseits zeigten der Veronalpuffer sowie der Boratpuffer nach HOLMES nur ganz geringe oder gar keine pH-Verschiebungen und hohe Titerverluste. Die Pufferkapazität an

Tabelle 11

Indirekter Vergleich der Ionenstärke verschiedener Puffer und die Beziehung zum Titerverlust

Puffer	Molarität	AusgangspH	pH nach Sterilisieren	Änderung durch Sterilisieren	pH mit 10-1 Viruszusatz	Änderung durch Virus	Mittlere Titerabnahme* in Zehnerpotenzen
Isotonischer Acetat-Veronalpuffer		7,6	7,6	0	7,4	0,2	0
Veronal-Natrium	m/ 15	7,5	7,5	0	7,4	0,1	0,2
	m/ 25	7,6	7,6	0	7,4	0,2	0,4
	m/ 50	7,5	7,3	0,2	7,1	0,2	0,5
	m/ 90	7,6	7,4	0,2	7,2	0,2	0,7
	m/180	7,6	7,3	0,3	7,1	0,2	0,95
Universal-Veronalpuffer nach Michaelis		7,8	7,8	0	7,8	0	0,2
Isotonischer Puffer nach Hinsberg-Lang		7,8	8,4	+ 0,6	8,2	0,2	0
Glykokollpuffer nach Sørensen	m/ 10	9,5	9,2	0,3	9,0	0,2	2
	m/ 25	8,5			7,7	0,8	0
	m/ 50	8,5			7,5	1,0	0
	m/ 90	8,5			7,3	1,2	0
	m/180	8,5			7,2	1,3	0
Borat-Puffer nach Holmes		8,6	8,6	0	8,4	0,2	0,6
Isotonischer Phosphat-Puffer nach Pyl		8,2	7,8	0,4	7,4	0,4	0
Ringer-Locke-Tris-Lösung		7,8	7,8	0	7,6	0,2	0
		7,0			6,8	0,2	0
Phosphatgepufferte NaCl-Lösung		7,4	7,4	0	7,0	0,4	1,9

* durch Einfrieren und Auftauen

sich kann demnach keine große Bedeutung für die Stabilität des Virus beim Einfrieren und Auftauen haben.

4. *Der Einfluß der Viruskonzentration auf die Virusschädigung.* RIVERS (4) vermutete, die Viruskonzentration sei für die Schädigung beim Einfrieren von Bedeutung. Bei zahlreichen Haltbarkeitsversuchen erhielt PYL (19) ähnliche Hinweise. Er führte die größere Haltbarkeit stärkerer Viruskonzentrationen auf die Bildung von Virusaggregaten zurück. Damit verringere sich die aktive Oberfläche und schädigende Einflüsse fänden weniger Angriffspunkte. Ebenso deuteten PYL und KLENK (20) die besseren Ergebnisse der Virusaufbewahrung bei 0° C.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden anfänglich Verdünnungen von 10^{-1} eingefroren und dann austitriert. Hierbei zeigten sich aber keine eindeutigen Resultate. Der Titer war durchschnittlich 10^{-7} . Bedenkt man, daß dieser Titer 10 Millionen infektiösen Einheiten in der Impfdosis von 0,1 ccm

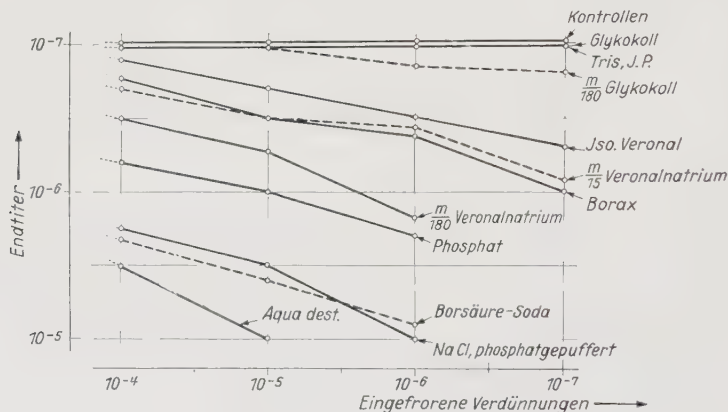


Abb. 3. Endtiter nach Einfrieren und Auftauen verschiedener Virusverdünnungen in verschiedenen Medien

entspricht und ein Virusverlust von 9 Millionen infektiösen Einheiten nötig wäre, um eine Verringerung des Titers auf 10^{-6} zu bewirken, dann erkennt man, daß geringere Virusverluste bei diesen Konzentrationen nicht zum Ausdruck kommen können. Bei den späteren Versuchen wurden deshalb die Viruslösungen in den Verdünnungen 10^{-4} bis 10^{-7} eingefroren, aufgetaut und danach austitriert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 wiedergegeben. Sie zeigen lediglich bei Glykokoll, Tris und dem isotonen Phosphat-Puffer nach PYL überhaupt keinen Virusverlust. Dagegen ist bei Aqua dest. der Verlust am größten. Bei allen dazwischen liegenden Lösungen nimmt der Titerabfall, mit der Virusverdünnung sich fächerförmig verteilend, zu.

In der Darstellung kommt deutlich zum Ausdruck, daß bei allen geprüften Lösungsmitteln, sofern das Virus mit zunehmender Verdünnung überhaupt geschädigt wurde, steigende Verluste entstanden.

5. *Die Bedeutung der Viskosität des Lösungsmittels für die Erhaltung von MKS-Virus beim Gefrierprozeß.* Untersucht wurden gepufferte und ungepufferte Lösungsmittel sowie Rinderammonionflüssigkeit. Puffersysteme, die im gefrorenen Zustand ihren pH-Wert zur sauren Seite hin ändern, wurden in diese

Untersuchung nicht mit einbezogen. Als ungepufferte Lösung diente Aqua dest., welches mit $n/10$ NaOH auf pH 8,0 und mittels Saccharose auf die gewünschte Viskosität gebracht wurde.

In der Abbildung 4 sind die Viskosität der verwendeten geeigneten Pufferlösungen (A) sowie von dest. Wasser (B), dessen Viskosität durch Saccharosezusatz künstlich gesteigert wurde, und der Virustiter nach dem Einfrieren und Auftauen in Beziehung gebracht. Der Verlauf der beiden Kurven zeigt, daß die Titer bei einer Viskosität unter 1 Centipoise schnell absinken. In gepufferten Lösungen sind die Virusverluste mit ansteigender Viskosität über 1 Centipoise bald gering, während in ungepuffertem Wasser der Ursprungstiter erst bei einer Viskosität über 1,7 Centipoise gehalten wird. Eine Sonderstellung nimmt die Rinderammonionflüssigkeit ein, welche trotz niedriger Viskosität von 0,89 Centipoise nur einen Titerverlust von 0,6 Zehnerpotenzen zeigt.

Abb. 4. Beziehung zwischen Viskosität und Titerwerten nach Einfrieren und Auftauen

In Abbildung 5 sind ähnliche Kurven dargestellt von den schlechten Pufferlösungen wie $m/90$ Veronal-Natrium (A), phosphatgepufferter Kochsalzlösung (B) und dest. Wasser (C). Hier wurde die Viskosität sämtlicher Flüssigkeiten durch Saccharose stufenweise erhöht, um zu ermitteln, ob und wie weit die Brauchbarkeit dieser für MKS-Virus ungünstigen Lösungsmittel gebessert werden kann. Die Kurve A verläuft ebenso wie die Kurve A der Abbildung 4, d. h., daß in Veronalnatrium, dessen Viskosität ohne Zusatz 0,98 Centipoise betrug, schon bei einer inneren Reibung über 1,1 Centipoise praktisch kein Virusverlust mehr eintrat. In der gepufferten NaCl-Lösung war zur Erreichung eines unbedeutenden Virusverlustes eine Viskosität von 1,2, bei dest. Wasser eine solche von 1,7 Centipoise nötig.

Aus diesen Darstellungen geht hervor, daß in gepufferten Lösungsmitteln mit einer Viskosität unter 1 Centipoise größere Titerverluste entstehen als in höher viskosen Puffern. Das ungepufferte Wasser erforderte eine höhere Viskosität (über 1,7 Centipoise), um Virus vor den schädlichen Einflüssen beim Einfrieren und Auftauen zu schützen. In wässrigen Lösungsmitteln mit einer Viskosität unter 0,95 Centipoise scheint das Virus unabhängig von der Pufferung beim Einfrieren und Auftauen zerstört zu werden, wenn nicht andersartige Stabilisatoren, wie z. B. in Rinder-

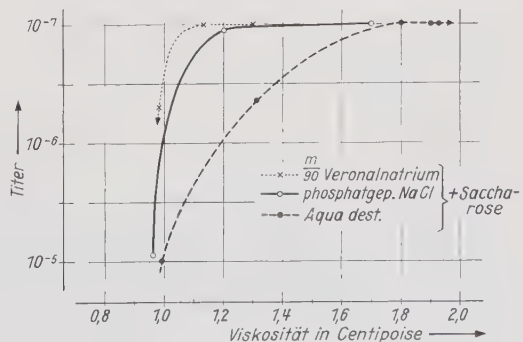
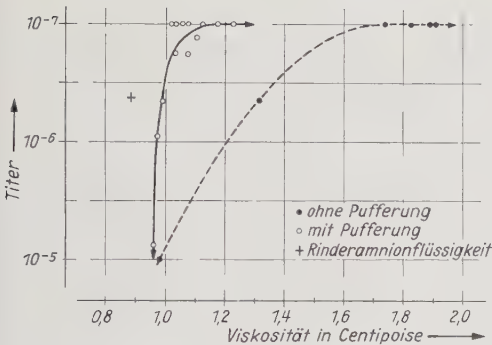


Abb. 5. Beziehung zwischen Viskosität und Titerwerten nach Einfrieren und Auftauen

ammonionflüssigkeit, vorhanden sind. Die Darstellung zeigt, daß an sich schlechte Lösungsmittel allein durch die Viskositätserhöhung brauchbar werden.

Dieser offensichtliche Einfluß der Viskosität dürfte auch bei konzentrierten Salzlösungen eine Rolle spielen. So fanden z. B. STOCKMAN und MINETT (9) das Virus in konzentrierter NaCl-Lösung noch nach 3 Monaten infektiös. An anderer Stelle berichten PYL und KLENK (21), daß MKS-Virus in hochprozentigen Salzlösungen besser haltbar sei. Dieses Ergebnis sei nicht von der

Tabelle 12

Zusammenstellung von Puffersystemen, die sich zum
Einfrieren von MKS-Virus eignen

Puffer	x-mal eingefroren	—log (LD ₅₀) der Kontr.	Endtiter			Durchschn. Verlust in Zehner- potenzen
			10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	
Isotonischer	1	7,1	7,1	7,1	7,1	0
Glykokollpuffer	4	7,1	7	6,8	6,8	0,2
nach Hinsberg-Lang	8	7,1	6,8	6,5	6,5	0,5
	16	7,1	>6	>6	>6	<1
Glykokoll nach	1	7,3	7,1	7,3	7,0	0,2
Sörensen von m/10	4	7,2	7,2	7,0	6,7	0,2
bis m/90						
Isotonischer	1	7,5	7,3	7,5	7,3	0,1
Phosphatpuffer, nach	10	7,5	7,0	7,0	6,8	0,5
Pyl hergestellt						
Ringer-Locke-Tris-	1	7,0	7,0	7,3	7,0	0
Lösung, isotonisch	4	7,0	7,0	6,4	6,2	0,5
	8	7,0	6,7	6,3	6,0	0,6
	16	7,0	6,5	6,0	<6,0	0,8
Veronal-Natrium	1	7,1	6,6	6,7	6,5	0,5
m/25						
Universal-Veronal	1	7,2	7,0	7,0	6,5	0,4
	10	7,2	6,8	6,2	6,0	0,9

Art des puffernden Salzes abhängig, sondern eine höhere Salzkonzentration begünstige lediglich eine Aneinanderlegung von Virusteilchen zu Aggregaten.

Im vermutlichen Bau eines Virusteilchen liegen gewisse Hinweise für den wahrscheinlichen Wirkungsmechanismus der Viruserhaltung bzw. -zerstörung. Das MKS-Virus ist in seiner Gestalt und Zusammensetzung noch nicht genau bekannt. Man weiß, daß die tierischen Virusarten Eiweißnatur besitzen. Mag das Virusteilchen nun linear oder sphäroid aufgebaut sein, formend wirken in jedem Falle innermolekulare Kräfte, z. B. in Gestalt von Peptidbindungen, Schwefelbrücken, Ionen- und Wasserstoffbindungen (POLLARD, 23).

Es ist wahrscheinlich, daß die Zerstörung des Virus wohl an den schwächeren Bindungen mit Auflockerung des Moleküls einsetzt und damit den Zerfall in kleinere Einheiten einleitet. Diese Auflockerung der innermolekularen Bindungen wird durch eine höhere Viskosität des umgebenden Mediums offenbar erschwert.

6. *Puffersysteme, die sich zum Einfrieren von MKS-Virus eignen.* Die als geeignet zum Einfrieren von MKS-Virus befundenen Puffersysteme sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Gemeinsam ist den als gut befundenen Pufferlösungen, daß nach einmaligem Einfrieren und Auftauen auch in extremen Virusverdünnungen kein nennenswerter Virusverlust entsteht. Nicht ganz so gut erscheinen die Veronalpuffer.

Alle diese Puffer, mit Ausnahme des isotonischen Puffers nach PYL, enthalten organische Substanzen. Sie sind durchweg einwertig und bringen keine freiwerdenden Wasserstoffionen mit. Als wirksame Komponenten der Moleküle aller drei Puffersubstanzen — des Glykokolls, des Trishydroxymethylaminomethans und des Veronals — treten die Atomgruppen -NH_2 , -COOH und -OH in Erscheinung.

Daß das MKS-Virus in Gegenwart auch geringer Mengen von Glykokoll, z. B. in 90- und 180-facher molarer Verdünnung, noch wenig geschädigt wird,

Tabelle 13

Puffersysteme, die sich für das Einfrieren von MKS-Virus nicht eignen

Puffer	pH-Wert (steril)	pH-Wert 10—1 Viruszusatz	Grad des Farb- umschlags	Durchschn. Verlust in Zehner- potenzen
Phosphat-Puffer nach Sørensen	7,5	7,5	+++	1,1
Borat-Puffer nach Holmes	7,8	7,6	++	2
	8,6	8,4	+	0,6
Borax-Kaliumbiphosphat- Puffer nach Kolthoff	7,5	7,4	+	0,4
Borsäure-Soda-Puffer nach Atkins und Pantin	7,6	7,6	+	1,6

+++ starker
++ mittlerer
+ schwacher } Umschlag in den sauren pH-Bereich

ist bemerkenswert. Nach PYL und KLENK (20) kann die Wirkung der als Puffer dienenden Salze wegen der niederen Salzkonzentration vernachlässigt werden. Nur die Wasserstoffionen müssen als schädigend berücksichtigt werden. Zieht man die Natur des Glykokolls als einfachste Aminosäure in Betracht, so liegt der Gedanke nahe, Glykokoll wirke geradezu schützend, vielleicht durch Anlagerung an bestimmte Atomgruppen des Virus, an denen eine Schädigung einsetzt.

Es ist bereits bekannt, daß das MKS-Virus geschädigt wird, wenn die Kälte wiederholt einwirkt. Wie die Tabelle zeigt, ist dies auch bei den angesetzten guten Pufferlösungen nach 10- bis 15-maligem Gefrieren der Fall.

7. *Puffersysteme, die im gefrorenen Zustand ihren pH-Wert ändern.* Die Tabelle 13 bringt eine Zusammenstellung von Puffersystemen, die in gefrorenem Zustand eine Säuerung erkennen ließen. Zugesezte Indikatoren, Phenolrot 1:10 000 oder Spezialindikatorpapier Merck, pH 5,4—7,0, das ausgelaugt wurde, änderten ihre Farben. Der direkte pH-Wert ließ sich auf Grund der Farbe nicht genau bestimmen, weil die Farbtöne durch die Eiskristalle anderen

Charakter erhielten. Die Tatsache einer pH-Verschiebung war jedoch eindeutig zu erkennen. Die Salze dieser Puffer sind mehrwertig, anorganisch und bringen größere Mengen freierwerdender Wasserstoffionen mit. Die sauer werdenden Puffersysteme sind deshalb zum Einfrieren von MKS-Virus ungeeignet.

Diskussion der Ergebnisse

Die Tabelle 10 zeigt, daß die Zerstörung des MKS-Virus unabhängig ist von der Geschwindigkeit des Einfrierens und Auftauens. Dieses Verhalten des MKS-Virus entspricht den Beobachtungen von NANTEL (5) über den Einfluß des Auftauens auf das Virus der E.E.E.

Der Gefrierprozeß schädigt das MKS-Virus, doch hängt das Maß der Schädigung vom Lösungsmittel ab. Es ist nicht zu klären, ob das Gefrieren oder Auftauen mehr schädigt; wahrscheinlich sind beide in gleichem Maße schädlich. Diese Ergebnisse weichen von anderen Beobachtungen in der Biologie und der Mikrobiologie ab. Lebende Einheiten mit fester Begrenzung, semipermeablen Wänden und hohem Wasser- und Saftgehalt reagieren auf den Gefrierprozeß unterschiedlich. Rasches Einfrieren und langsames Auftauen wirken dabei am schonendsten (STILLE, 22). Die vorliegenden Befunde sprechen dafür, daß das MKS-Virus durch die Änderung des Aggregatzustandes des Mediums sich nicht wesentlich verändert und daß Dehydrations- und Hydrationsvorgänge, welche bei Zellen und Mikroorganismen die spätere Lebensfähigkeit entscheidend bestimmen, eine bedeutende Rolle nicht spielen.

Aus diesem Grunde ist es möglich und eine altbewährte Methode, das MKS-Virus aus Gewebsteilen durch Einfrieren und Auftauen zu gewinnen. Voraussetzung für die verlustlose Virusgewinnung dieser Art, z. B. aus Gewebekulturen, ist die Verwendung von geeigneten Zellkulturmedien. Hierfür kommen die Lösungsmittel der Tabelle 12 in Frage.

Die Zerstörung des MKS-Virus hängt nach PYL (19, 21) mit einer reinen Wasserstoffionenwirkung zusammen, vorausgesetzt, daß nicht hohe Temperaturen die Ursache sind. Es bleibt hier die Frage, wie diese Wirkung erfolgt. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß für den Grad der Inaktivierung des Virus auch der weiteren Beschaffenheit seiner Umgebung, nicht nur der Wasserstoffionenkonzentration, eine wesentliche Bedeutung zukommt. In Lösungen mit geringer innerer Reibung ist die Resistenz gegen zerstörende Einflüsse schwächer. Im selben Sinne kann man die bekannte längere Haltbarkeit von höher konzentriertem Virus und von Viruslösungen in stärkeren Salzkonzentrationen deuten. Dieses Verhalten kann vielleicht folgendermaßen erklärt werden:

Weniger stabile innermolekulare Bindungen des Virus lösen sich bei physikalischer Beanspruchung, eine Auflockerung findet statt und der anschließende Zerfall hat eine entsprechende Abnahme der biologischen Fähigkeiten des Virus zur Folge. Die Versuche von TYRELL und HORSFALL (6) mit Influenza-, Mumps- und Newcastle-Virus beweisen, daß aus dem Gefrierprozeß kleinere Teile des Virus hervorgehen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob das auch bei dem sehr kleinen MKS-Virus der Fall ist.

Betrachtet man von diesen Gesichtspunkten aus das MKS-Virus, wie es natürlicherweise von kranken Tieren ausgeschieden wird und durch leichte Verbreitung Seuchengänge verursacht, so befindet es sich in jeder Form der Ausscheidung in Medien mit hoher Viskosität. Vor allem der Speichel besitzt Schleimstoffe, Glykoproteide. Die hohe Resistenz des MKS-Virus in der Natur

bei Seuchengängen ist erwiesen (TRAUTWEIN, 24, 25) und die hochgradige Empfindlichkeit im Laboratorium, wo mit wäßrigen Viruslösungen gearbeitet wird, eine Erfahrungstatsache. Dieser Fragenkomplex, der eng mit der Desinfektion zusammenhängt, bedürfte noch eingehender wissenschaftlicher Untersuchungen. Die übliche Desinfektion mit Natronlauge bei Seuchengängen stützt sich ausschließlich auf die hohe Empfindlichkeit des Virus in einen extremen pH-Bereich. Auch hierbei wird die Viskosität des Mediums zu berücksichtigen sein.

Sollte sich die Viskosität auch auf die Haltbarkeit günstig auswirken, was in besonderen Haltbarkeitsversuchen noch erwiesen werden müßte, so würden sich daraus weitere Möglichkeiten zur dauerhaften Konservierung des Virus ergeben. Auf jeden Fall schützten viskositätserhöhende Mittel wie Saccharose das MKS-Virus in den vorliegenden Versuchen auch bei geringerem Zusatz wesentlich besser als Glycerin, das bisher als bestes Schutzmittel gegen thermische Einflüsse galt. So könnte in der Praxis die Einsendung von Aphthenmaterial zur Typendiagnose durch Verwendung von Saccharose als Stabilisator wesentlich erleichtert werden. Auch könnte man daran denken, die Haltbarkeit der MKS-Vaccine gegen Temperaturschwankungen und besonders gegen Frost durch einen stabilisierenden Zusatz von Saccharose zu verbessern.

Zusammenfassung

Untersucht wurde das Verhalten des Virus der Maul- und Klauenseuche aus Muskulatur von Säuglingsmäusen beim Einfrieren von Temperaturen von -20°C und -65°C und beim Auftauen bei 4°C im Kühlschrank, bei 22°C Zimmertemperatur und bei 37°C im Wasserbad in Gegenwart verschiedener Medien. Verwendet wurden Puffersysteme des schwach sauren, des neutralen und des schwach alkalischen Bereiches.

Dabei ergab sich, daß die Viruszerstörung in den brauchbaren Flüssigkeiten völlig unabhängig war von der Geschwindigkeit bzw. der Temperatur des Einfrierens und Auftauens.

Für Gefrierversuche mit MKS-Virus erwies sich das Experimentieren bei pH 8,0 als vorteilhaft. Ein wesentlicher Einfluß des pH-Wertes auf den Grad der Schädigung war im optimalen Bereich von pH 7,0 bis 9,0 nicht zu erkennen. Der Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, der Boratpuffer nach HOLMES, der Borax-Kaliumbiphosphat-Puffer nach KOLTHOFF und der Borsäure-Soda-Puffer nach ATKINS und PANTIN wurden beim Einfrieren sauer und waren deshalb ungeeignet.

Das Maß der Schädigung des MKS-Virus war bei den einzelnen Lösungsmitteln sehr unterschiedlich. Der Virusverlust war am größten bei den zuletzt genannten Puffern sowie bei Aqua dest., geringer bei Rinderamnionflüssigkeit. In Gegenwart des Glykokollpuffers, des isotonen Phosphatpuffers (I. P.) und der Ringer-Locke-Tris-Lösung wurde das Virus durch einen einmaligen Gefrierprozeß nicht geschädigt. Nach 10- bis 15-maliger Kälteeinwirkung setzte auch bei diesen Lösungsmitteln eine Schädigung des Virus ein.

Eine Erhöhung der Viskosität sowohl bei gepufferten als auch bei ungepufferten Lösungen wirkte sich schützend gegenüber schädigenden Einflüssen auf das MKS-Virus aus. Lösungen mit einer Viskosität von 0,95 Centipoise und weniger waren ausnahmslos ungeeignet für Gefrierversuche mit diesem Erreger. Bei einer Viskosität des Mediums über 1,7 Centipoise trat auch ohne Pufferung keine Schädigung ein.

Eine äußerst wirksame Viskositätserhöhung und Schutzwirkung war durch Saccharose-Zusatz zu erreichen.

Summary

The behaviour of the virus of foot-and-mouth disease when subjected to freezing and thawing in various media

The behaviour of foot-and-mouth disease virus from the musculature of suckling mice was studied when it was subjected to freezing at temperatures of -20° and -60° C., and also by thawing at 4° C. in the refrigerator, at 20° C. room temperature, and at 37° C. in a water bath. Various media, including buffer systems of weakly acid, neutral and weakly alkaline reaction were used.

Damage to the virus did not depend on the speed or temperature of freezing and thawing.

Freezing experiments with virus gave favourable results at pH 8.0 but no significant influence of pH was seen in the range 7.0 to 9.0.

The phosphate buffer of SÖRENSEN, the borate buffer of HOLMES, the borax potassium biphosphate buffer of KOLTHOFF and the boric acid soda buffer of ATKINS and PANTIN were acid in reaction when frozen, and were on that account unsatisfactory.

The amount of damage to the virus varied widely with the different media. Loss of virus was greatest with the buffers mentioned above and with distilled water, and less with bovine amniotic fluid. In contrast, glycolol buffer, isotonic phosphate buffer (I. P.) and Ringer-Locke-Tris solution caused no damage to the virus after a single freezing, but did so when the process was repeated ten to fifteen times.

Increasing the viscosity of buffered and unbuffered solutions had a protective effect on the virus. Solutions with a viscosity of 0.95 centipoise and less were without exception unsuited for freezing experiments with this virus. When the viscosity of the media was above 1.7 centipoise there was no damage to the virus even when buffer was omitted.

The addition of saccharose to media produced a very striking increase in viscosity and protective effect on the virus.

Résumé

Le comportement du virus de la fièvre aphteuse après congélation et dégel dans différents milieux

On étudia le comportement du virus de la fièvre aphteuse provenant de la musculature de souriceaux après congélation à des températures de -20° et -65° C. et dégel à 4° C au frigidaire, à 22° à la température de la chambre et à 37° au bain-marie. On utilisa des solutions-tampon légèrement acides, neutres et légèrement alcalines.

On constata au cours de ces essais que la destruction du virus dans les liquides utilisables était entièrement indépendante de la rapidité ou de la température de la congélation et du dégel.

Dans les essais de congélation avec le virus de la fièvre aphteuse, il est avantageux d'expérimenter au pH 8,0. Une influence appréciable de la valeur du pH sur l'intensité du dommage causé ne put être observée dans les limites optimales du pH comprises entre 7,0 et 9,0. La solution-tampon phosphatée de Sørensen, le tampon au borate selon Holmes, le tampon au borax, et bi-

phosphate de potassium selon Kolthoff et le tampon à l'acide borique et soude selon Atkins et Pantin devenaient acides lors de la congélation et étaient par conséquent inutilisables.

L'importance des dommages subis par le virus de la fièvre aphteuse était très différente selon les solutions employées. La perte la plus grande fut constatée avec les tampons nommés ci-dessus, ainsi qu'avec de l'eau distillée. Elle était plus faible avec du liquide amniotique bovin. En présence du tampon au glycol, du tampon au phosphate isotonique (I. P.) et de la solution de Ringer-Locke-Tris le virus ne fut pas endommagé par une congélation unique. Si l'on répétait cette congélation 10 à 15 fois on observait cependant, même avec ces solutions, une détérioration du virus.

Une augmentation de la viscosité tant dans les solutions tamponnées que dans les solutions non tamponnées avait une action protectrice sur le virus de la fièvre aphteuse. Les solutions qui avaient une viscosité inférieure ou égale à 0,95 Centipoise étaient sans exception inutilisables pour des essais de congélation avec ce virus. Si la viscosité atteignait 1,7 Centipoise ou plus, on ne constatait aucun dommage, même sans tampon.

Par l'adjonction de saccharose on put obtenir une augmentation de viscosité qui assurait une protection très efficace.

Resumen

Sobre el comportamiento del virus aftoso al congelar y deshelar en presencia de varios medios

Se ha estudiado el comportamiento del virus de la glosopeda procedente de musculatura de ratones lactantes al congelar a temperaturas de -20° y -65° C. y al deshelar a 4° C. en el frigorífico, a la temperatura ambiente a 22° C., y a 37° C. en baño maría en presencia de varios medios. Se utilizaron sistemas tampón de las zonas ligeramente ácida, neutra y ligeramente alcalina.

Se obtuvo por resultado que la destrucción del virus en los líquidos útiles era independiente por completo de la velocidad y de la temperatura de congelación y deshielo.

En los ensayos de congelación con virus aftoso resultó ventajosa la experimentación a pH 8.0. No se pudo reconocer ninguna influencia esencial del valor del pH sobre el grado de lesión en la zona óptima de pH 7.0 a 9.0. El tampón al fosfato según SÖRENSEN, el tampón al borato según HOLMES, el tampón al bórax-fosfato bipotásico según KOLTHOFF y el tampón ácido bórico-carbonato sódico según ATKINS y PANTIN se acidificaban al enfriarse y por ello eran poco apropiados.

El grado de detrimento del virus aftoso variaba mucho con los distintos disolventes. La pérdida de virus era mayor en los tampones citados en los últimos lugares, así como en agua destilada, y menor en el líquido amniótico de vaca. En presencia de tampón a la glicocola, del tampón isotónico al fosfato y de la solución Ringer-Locke-Tris el virus no fué menoscabado mediante un único proceso de congelación. Tras actuar el frío de 10 a 15 veces también en estos disolventes se produjo cierto detrimento del virus.

El aumento de la viscosidad tanto en soluciones tamponadas como en las no tamponadas repercutió de manera protectora frente a los influjos perjudi-

ciales sobre el virus aftoso. Las soluciones con una viscosidad de 0.95 centipoises y menos no eran apropiadas sin excepción alguna para los ensayos de congelación con este agente etiológico. En la viscosidad del medio superior a 1.7 centipoises no se produjo ningún detrimento incluso sin amortiguación.

Por medio de la adición de sacarosa se pudo obtener un aumento de la viscosidad y acción protectora extraordinariamente eficaces.

Literaturverzeichnis

1. BARRAT, I. O. W., 1904: Centrifugation and disintegration in relation to the virus of Rabies, Zbl. Bakter. I Orig. 35, 769. • 2. SANDERSON, E. S.: Science IX, 377. • 3. D'HÉRELLE, 1926: The Bacteriophage and his Behavior, Baltimore (Engl.) 300. • 4. RIVER, T. M., 1927: Effect of repeated Freezing and Thawing on colon Bacilli, Virus III, Vaccine-Virus, Herpes Virus, Bacteriophage, Complement and Trypsin, J. exper. Med. 45, 11. • 5. NANTEL, A., 1951: Influence de la Decongélation sur le titre du Virus de l'Encephalomyelite équine (Typ Est) EEE, Ann. Inst. Pasteur, Paris 80, 203. • 6. TYRRELL, A. J. and F. L. HORSFALL, 1954: Disruption of Influenza Virus, J. exper. Med. 99, 321. • 7. LÖFFLER, F. und P. FROSCH, 1954: zitiert nach Möhlmann, H.: Der derzeitige Stand der Forschung über das Virus der Maul- und Klauenseuche, Arch. exper. Med. 8, 316. • 8. ROUX, VALLÉE, CARRÉ et NOCARD, 1921: Résumé d'expériences sur la fièvre aphteuse, C. R. 173, 1141. • 9. STOCKMAN, S. and F. C. MINETT, 1926: Researches on the Virus of Foot and Mouth Disease, J. Comp. Path. 39, 1—30. • 10. Fourth Progress Report of the Foot and Mouth Disease Research Committee, London, 1931. • 11. RÖHRER, H., H. MÖHLMANN und G. PYL, 1950: Erfahrungen bei der Herstellung und Anwendung des Riemser Adsorbat-Impfstoffes gegen MKS, Exper. Vet. Med. 1, 1. • 12. REED, L. J. and H. MUENCH, 1938: A simple method of estimating fifty per cent endpoints, Am. J. Hyg. 27, 493. • 13. PYL, G., 1952: Reinigung des neurotrop modifizierten Meerschweinchen-B-Stammes des Maul- und Klauenseuchevirus und sein dadurch verändertes Verhalten bei der Adsorption, Arch. exp. Vet. Med. 6, 113. • 14. SCHWÖBEL, W.: Mündliche Mitteilungen. • 15. THIERY et GIRARD, 1950: Essais de conservation du Vaccin antiaphteux à différentes températures, Bull. Off. internat. Epiz. 33, 774. • 16. PYL, G. und H. MÖHLMANN, 1951: Über die Schutzwirkung des Glycerins gegen Frostschäden bei MKS-Vakzine, Exper. Vet. Med. 4, 41. • 17. MICHELSEN, E. and K. MIKKELSEN, 1945: Change of type in the virus of foot-and-mouth disease observed in connection with artificial drying of the virus, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 22, 406. • 18. MIEHLER, H.: Unveröffentlichte Versuche (mündl. Mitt. an E. Traub). • 19. PYL, G., 1933: Infektiositätsänderungen und Aktivierungsprozesse beim Virus der Maul- und Klauenseuche, Z. Hyg. 114, 501. • 20. PYL, G. und L. KLENK, 1933: Haltbarkeitsversuche mit Virus der MKS, Zbl. Bakter. I Orig. 128, 161. • 21. PYL, G. und L. KLENK, 1936: Haltbarkeit des Virus der MKS in hochprozentigen Salzlösungen, Zbl. Bakter. I Orig. 137, 433. • 22. STILLE, B., 1950: Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen, Arch. Mikrobiol. 14, 554. • 23. POLLARD, E. C.: The Physics of Viruses, Academic Press, Inc., Publishers New York 10, NY. • 24. TRAUTWEIN, K., 1926: Versuche zur Tenazität des Maul- und Klauenseuche-Virus in der Außenwelt, Arch. Tierhk. 54, 273. • 25. TRAUTWEIN, K., 1929: Maul- und Klauenseuche, Erg. Hyg. 10, 561.

Lebenslauf

Am 29. April 1931 wurde ich in Hardt, Kreis Rottweil, geboren. Meine Eltern sind der Bauer Johannes Storz und seine Ehefrau Therese, geborene Klausmann.

Ich besuchte die Volksschule in Hardt und anschließend die Oberschule in Schramberg. Dort bestand ich im Juli 1951 die Reifeprüfung.

Als Werkstudent in der Uhrenfabrik Gebrüder Jung-hans A. G. in Schramberg verbrachte ich das folgende Jahr. Mein Studium der Veterinärmedizin begann ich im April 1952 an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover. Ich blieb dort vier Semester bis zum Ablegen des Physikums im April 1954. An der Universität München studierte ich danach drei Semester und kehrte dann nach Hannover zurück, wo ich am 15. Februar 1957 die Tierärztliche Prüfung bestand.

An der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen bearbeitete ich in der Folgezeit das Thema meiner Dissertation. Jetzt bin ich als Praktikant bei Dr. Essig in Sindelfingen.

